

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Mai 2004 (06.05.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/038024 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/30,
15/863, A61K 39/002

(74) Anwalt: ZIMMER, Franz-Josef; Grünecker, Kinkeldey,
Stockmair & Schwanhäusser, Maximilianstrasse 58, 80538
München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/010723

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. September 2003 (26.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(30) Angaben zur Priorität:
102 49 390.1 23. Oktober 2002 (23.10.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT
[DE/DE]; Grabengasse 1, 69117 Heidelberg (DE).
GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT
UND GESUNDHEIT [DE/DE]; Ingostaedter Landstrasse
1, 85764 Neuherberg (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SUTTER, Gerd
[DE/DE]; Unertlstrasse 4, 80803 München (DE). BU-
JARD, Hermann [DE/DE]; Remlerstrasse 9, 69120
Heidelberg (DE). WESTERFELD, Nicole [DE/DE];
Schillerstrasse 1, 69115 Heidelberg (DE). JUN, Miao
[CN/DE]; Rombachweg 6a, 69118 Heidelberg (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: RECOMBINANT MVA STRAINS AS POTENTIAL VACCINES AGAINST P. FALCIPARUM MALARIA

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTE MVA-STÄMME ALS POTENTIELLE IMPFSTOFFE GEGEN P. FALCIPARUM-MALA-
RIA

(57) Abstract: The invention relates to MVA-based recombinant viruses comprising at least one nucleic acid coding for Plasmodium falciparum MSP-1 protein, a fragment or mutein thereof. The invention also relates to a method for the production of recombinant viruses, virus-containing vaccines and to the utilization of said recombinant viruses for the prophylaxis and/or therapy of malaria.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft rekombinante Viren auf MVA-Basis, die wenigstens eine ein Plasmo-
dium falciparum MSP-1-Protein, ein Fragment oder Mutein davon kodierende Nukleinsäure umfassen. Ferner werden Verfahren
zur Herstellung der rekombinanten Viren, Virus enthaltende Vakzine und die Verwendung der rekombinanten Viren zur Prophylaxe
und/oder Therapie von Malaria bereitgestellt.



WO 2004/038024 A1

Rekombinante MVA-Stämme als potentielle Impfstoffe gegen *P.falciparum*-Malaria

Einleitung

Die Erfindung betrifft die Herstellung rekombinanter *Vaccinia*-Viren des Stamms MVA (*Modifiziertes Vaccinia Virus Ankara*) zur rekombinanten Herstellung des vollständigen Malaria-Antigens gp190/MSP-1 des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* sowie einzelner natürlich vorkommender Domänen und Teile derselben. Ferner betrifft die Erfindung die Nutzung der rekombinanten MVA, welche die synthetische DNA-Sequenz des Malaria-Antigens sowie Teile derselben integriert in das Virus-Genom tragen als Impfstoff zur Immunisierung gegen Malaria.

Malaria zählt zu den gefährlichsten Infektionskrankheiten der Welt. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge werden jährlich 400 bis 900 Millionen Krankheitsepisoden registriert. Nach Informationen der Multilateralen Initiative gegen Malaria (MIM) sterben zwischen 700.000 und 2,7 Millionen Menschen jedes Jahr an der Infektion (MIM, 2001). Dabei sind in 99 Ländern 40% der Weltbevölkerung einem Malariarisiko ausgesetzt. Verursacht wird die Krankheit durch einzellige Protozoen der Gattung *Plasmodium* aus dem Phylum *Apicomplexa*. Es gibt vier Arten, die den Menschen infizieren: *Plasmodium malariae*, verantwortlich für Malaria quartana, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale*, beide verursachen Malaria tertiana und schließlich *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica und letztlich verantwortlich für fast alle tödlichen Infektionen.

Ihre Verbreitung nimmt derzeit wieder zu. Dies ist vor allem auf eine intensive Resistenzbildung der Malaria-Erreger zurückzuführen, die dadurch gefördert wird, dass die zur Therapie benutzen Medikamente ebenfalls zur Prophylaxe empfohlen und eingesetzt werden. Neben der Suche nach neuen Chemotherapeutika konzentriert sich die Forschung auf die Entwicklung von Impfstoffen, da im Laufe von Malaria-Infektionen im Menschen Immunitätsmechanismen einsetzen, die sich in einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber den Plasmodien äußert, wie sich in der Entwicklung verschiedener Arten von Immunität bei Menschen in Malaria-epidemischen Regionen zeigt.

MSP-1 als potentieller Impfstoff

MSP-1, das Hauptoberflächenprotein von Merozoiten, der invasiven Form der Blutstadien der Malaria-Erreger, ist ein 190 – 220 kDa Protein. Dieses Protein wird spät während der Entwicklung der Merozoiten in kleinere Proteinfragmente prozessiert, die bis zur Invasion von Erythrozyten durch die Parasiten als Komplex verankert über einen Glycosylphosphatidyl-Inositol-Anker auf der Merozoiten-Oberfläche vorliegen und isoliert werden können.

Die Sequenzen der MSP-1-Proteine verschiedener *P. falciparum*-Stämme fallen in zwei Gruppen, die nach zwei repräsentativen Isolaten K1 und MAD20 benannt wurden. Insgesamt besteht das Protein aus mehreren hochkonservierten Regionen, aus dimorphen Bereichen, die sich jeweils einer der beiden zuordnen lassen und aus zwei relativ kleinen oligomorphen Blöcken im N-terminalen Teil des Proteins (Fig. 1; Tanabe et al., 1987).

Die Immunisierung von Mäusen mit dem aus *P. yoelii*-Parasiten aufgereinigten Protein schützte die Tiere vor der andernfalls tödlichen Infektion (Holder and Freeman, 1981). Auch der Transfer von monoklonalen Antikörpern gegen MSP-1 von *P. yoelii* vermittelte Schutz im Mausmodell (Majarian et al., 1984).

Neben Studien an Mäusen wurden auch *Saimiri* und *Aotus*-Affen mit nativem, immunaffinitätsgereinigtem MSP-1 immunisiert. In diesen Versuchen schützte das aus *P. falciparum* gewonnene Protein partiell (Perrin et al., 1984) bzw. völlig (Siddiqui et al., 1987) gegen die folgende Infektion mit dem Parasiten.

Eine Aufreinigung von nativem Material aus *Plasmodien* ist allerdings aufwendig und lässt keine Produktion im großen Maßstab zu. Daher konzentriert sich die Impfstoff-Forschung auf die Entwicklung rekombinanter Vakzine.

So wurden Mäuse erfolgreich mit aus *E. coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* gereinigtem MSP-1-19 immunisiert (Daly and Long, 1993; Ling et al., 1994; Tian et al., 1996; Hirunpetcharat et al., 1997), ebenso wie MSP-1-19 tragendes *Mycobacterium bovis* (Matsumoto et al., 1999). Alternativ zur Immunisierung mit nativen oder rekombinanten Proteinen wurde auch für MSP-1-19-kodierende DNA als Impfstoff eingesetzt und schützte immunisierte Mäuse vor der Infektion mit *P. chabaudi* (Wunderlich et al., 2000).

Die Immunisierungen von Affen mit rekombinantem MSP-1-19 und MSP-1-42 aus *P. falciparum* vermittelte teilweise Schutz (Kumar et al., 1995; Egan et al., 2000; Chang et al., 1996; Stowers et al., 2001). Die Interpretation von Immunsierungsversuchen an Affen ist

allerdings nur bedingt möglich, da eine statistische Auswertung der Ergebnisse auf Grund der geringen Versuchstierzahlen nicht gegeben ist.

In Phase I und II Studien zu MSP-1-Fragmenten als Impfstoff wurde deren Immunogenität auch im Menschen gezeigt. Dabei handelte es sich um p19 aus *P. falciparum* fusioniert an ein T-Helfer-Zell-Epitope des Tetanustoxins (Keitel et al., 1999) und die MSP-1-Blöcke 3 und 4 (Saul et al., 1999; Genton et al., 2000).

Einige epidemiologische Studien in endemischen Gebieten zeigten bei Erwachsenen eine Korrelation zwischen Antikörpertitern gegen MSP-1 und der Immunität gegen Malaria (Tolle et al., 1993; Riley et al., 1992; Riley et al., 1993).

Diese Untersuchungen zusammen mit den Immunisierungsstudien an Tieren belegen, dass es sich bei MSP-1 um einen vielversprechenden Kandidaten zur Entwicklung eines Malaria-Impfstoffs handelt.

Generell lassen sich diese Studien in zwei Ansätze unterscheiden, entweder wurde aus Parasiten aufgereinigtes Material oder in heterologen Systemen gewonnenes Material eingesetzt.

Sowohl für Funktionsuntersuchungen als auch für den Einsatz als Impfstoff müssen Proteine in guter Ausbeute, hoher Qualität und reproduzierbar herzustellen sein. Zwar läßt sich MSP-1 aus Parasiten aufreinigen, allerdings ist dies nur im kleinen Maßstab unter großem Aufwand möglich und daher für die Gewinnung von MSP-1 nach den genannten Kriterien auf diesem Weg nicht durchführbar.

Vaccinia-Viren gehören zur Gattung *Orthopoxvirus* in der Unterfamilie der *Chordopoxvirinae*. Es handelt sich bei den Pocken-Viren um komplexe Viren, die mit einem doppelsträngigen DNA-Genom von ca. 200 kb und einer Größe von 250 x 350 nm zu den größten bekannten Viren gehören. Sie bestehen aus einem quaderförmigen Virion, das von einer Membranhülle umgeben ist. In der Wirtszelle verläuft die Replikation und Generation der Pocken-Viren ausschließlich im Zytoplasma (zur Übersicht: Moss et al., 1996). Dabei besitzen *Vaccinia*-Viren ein sehr breites Wirtszellspektrum, sie infizieren nahezu alle Zellen sowohl von Menschen als auch Tieren stammend. 1953 isolierte und reinigte Anton Mayr den Dermovaccinia-Stamm Chorioallantois Vaccinia Ankara (CVA). Dieses Virus wurde über fortlaufende Passage auf Hühner-Embryo-Fibroblasten weiter vermehrt, und heraus kam ein attenuiertes Virus, das in Tier und Mensch keine Virulenz mehr zeigte (Stickl et al., 1974). Ungeachtet dessen konnte das Virus weiterhin zur Immunprophylaxe gegen durch Orthopockenviren hervorgerufenen Erkrankungen bei Mensch und Tier eingesetzt werden (Stickl et al.,

1974). Nach seinem Ursprungsort wurde dieses Virus *Modifiziertes Vaccinia-Virus Ankara* (MVA) genannt.

Molekulargenetisch betrachtet hat das Virus während der über 570 Passagen auf Hühner-Embryo-Fibroblasten 31 kb DNA-Sequenz seines Genoms, hauptsächlich in Form sechs großer Deletionen verloren, darunter wenigstens zwei Gene, die das Wirtszellspektrum und damit die Replikationsfähigkeit des Virus bestimmen (Meyer et al., 1991). Die Bildung infektiöser Viruspartikel ist bei der MVA-Infektion in den meisten von Säugetieren stammenden Zellen, einschließlich Zellen von Menschen, erst sehr spät im Infektionszyklus auf der Stufe des Virionenzusammenbaus blockiert, d.h. virale Gene unter der Kontrolle von Promotoren sowohl zur frühen als auch intermediären und späten Transkription können auch in nicht permissiven Zellen exprimiert werden. Das unterscheidet MVA von anderen attenuierten und replikationsdefizienten Pockenviren, wie z. B. *Vaccinia-Virus* NYVAC oder Kanarienvirus ALVAC, deren Infektion in den meisten vom Säugetier stammenden Zellen bereits vor der viralen DNA-Replikation unterbrochen ist (Tartaglia et al., 1992, Sutter and Moss, 1992).

Zur Malariaimpfstoffentwicklung wurden verschiedene rekombinante *Vaccinia*-Viren eingesetzt, dabei wurden replikationskompetente Viren des Typs Western Reserve und Copenhagen und attenuierte Viren der Typen NYVAC, ALVAC oder COPAC verwendet (Kaslow et al., 1991; Etlinger and Altenburger, 1991; Aidoo et al., 1997; Allsopp et al., 1996).

Im Zusammenhang mit dem attenuierten *Vaccinia*-Virus MVA wurden lediglich rekombinante Viren beschrieben, welche CSP aus dem Malaria-Parasiten *Plasmodium berghei* als Malaria-Antigen tragen (Schneider et al., 1998; Plebanski et al., 1998; Degano et al., 1999; Gilbert et al., 1999).

Ferner sind rekombinante *Vaccinia*-Viren beschrieben, die eine MSP-1-kodierende Sequenz enthalten. Die Autoren einer Publikation geben an, die native MSP-1-kodierende Sequenz in das Genom des Virustyps Western Reserve integriert zu haben, unterstützen diese Aussage aber nicht experimentell (keine Restriktionsanalysen, PCR, Northern-, Westernblotanalysen etc.). Eine Immunisierung von Saimiri-Affen mit diesen rekombinanten Viren führte nicht zur Bildung MSP-1-spezifischer Antikörper und blieb überdies auch ohne messbaren Einfluss auf die humorale Immunantwort gegen MSP-1 nach einer *P. falciparum*-Infektion (Pye et al., 1991).

In einer weiteren Veröffentlichung wird der Vektor NYVAC-Pf7 beschrieben, der unter anderem *msp-1* aus *P. falciparum* exprimiert. Die Seren von zwei der sechs immunisierten

Rhesusaffen zeigen in der Westernblotanalyse keine in der Publikation erkennbaren Signale gegen natives MSP-1. Die Signale von drei weiteren Tieren erkennen lediglich Teile des Proteinkomplexes, und nur das Serum eines der immunisierten Tiere erkennt ein breiteres Bandenspektrum. Insgesamt erscheinen jedoch auch diese Signale schwach. Quantitative Analysen zu MSP-1-spezifischen Antikörpern durch ELISA wurden nicht angeführt (Tine et al., 1996).

In Humanversuchen der Phase I/IIa mit NYVAC-Pf7 wurden weder eine zelluläre Immunantwort gegen MSP-1 noch eine durch ELISA nachweisbare humorale Immunantwort nachgewiesen (Ockenhouse et al., 1998).

Im Gegensatz dazu weisen Tine et al. (1996) intaktes MSP-1 in der Westernblot-Analyse nach, wobei widersprüchlich erscheint, dass MSP-1 mittels *P. falciparum* Signalsequenzen (vgl. Publikationen von Moran and Caras, 1994, Yang et al., 1997) aus der Zelle transportiert wird.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde ein rekombinantes *Vaccinia*-Virus bereitzustellen, das fähig ist

- DNA-Sequenzen, welche MSP-1 aus *P. falciparum* bzw. Teibereiche desselben kodieren, stabil integriert zu enthalten,
- diese Sequenzen effizient und reproduzierbar zu exprimieren und damit
- MSP-1 Protein in sekretierter oder Oberflächen-verankerter Form herzustellen, um
- einen Wirt zu immunisieren und dabei
- eine zelluläre und humorale Immunantwort hervorzurufen.

Die der vorliegenden Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung eines rekombinanten MVA-Virus, das zur Infektion, Replikation und Expression von MSP-1 in einem Wirt fähig ist. Ferner werden Verfahren zur Herstellung und Verwendung des rekombinanten Virus angegeben.

Erfindungsgemäß bedeutet der Ausdruck "Virus auf MVA-Basis" ein von MVA abgeleitetes Virus, das in nicht-essentiellen Regionen des Virusgenoms eine oder mehrere Mutationen aufweist. Die essentiellen Regionen des MVA-Virus sind hierbei alle Genomabschnitte des MVA-Virus, die für den Erhalt der viralen Genexpression und die Vermehrungsfähigkeit des MVA-Virus notwendig sind, hierzu zählen z. B. die für virale RNA-Polymerase-Untereinheiten bzw. die virale DNA-Polymerase kodierenden Gensequenzen. Vorzugsweise ist das Virus auf MVA-Basis das MVA-Virus.

Das aus dem Stand der Technik bekannte *Vaccinia*-System NYVAC-Pf7 beruht auf dem Basisvirus NYVAC, welches ursprünglich dem *Vaccinia*-Virus-Stamm Copenhagen entstammt und durch die gezielte Deletion von 18 offenen Leserastern attenuiert wurde. Jedoch ist bei NYVAC in Säugerzellen die DNA-Replikation blockiert (Tartaglia et al., 1992), während bei MVA die Virusassemblierung unterbunden wird. Dies hat den Vorteil, dass im Gegensatz zu NYVAC in MVA die späte Genexpression stattfindet, welche für die Expression rekombinanter Gene genutzt werden kann. MVA kann daher sowohl während der frühen Transkriptionsphase bevorzugt eine zytotoxische T-Zell-Antwort induzieren als auch den humoralen Zweig der Immunantwort durch die hohe Protein-Expression während der späten Phase stimulieren.

MVA, das bereits während der Pockenschutz-Impfkampagne umfangreich eingesetzt wurde, gilt als sehr sicheres Impfvirus am Menschen (Stickl et al., 1974).

Erfindungsgemäß wird ein rekombinantes Virus auf MVA-Basis bereitgestellt, umfassend wenigstens eine ein *P. falciparum* MSP-1-Protein, ein Fragment oder Mutein davon kodierende Nukleinsäure.

Die MSP-1-Aminosäuresequenz ist aus öffentlich zugänglichen Datenbanken erhältlich. 3D7 (MAD20-Isolat): CAA84556; FCB-1 (K1-Isolat): CAB36903. Beides aus der NIH-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Besonders bevorzugt ist die MSP-1-Protein kodierende Nukleinsäure eine in ihrem AT-Gehalt verringerte Nukleinsäure wie beschrieben in DE 19640817 A1, deren Offenbarungsgehalt hiermit aufgenommen wird. Insbesondere ist eine Nukleinsäure bevorzugt, die von der *P. falciparum*-MSP-1-Sequenz abgeleitet ist und bei der ein Großteil der Plasmodium-Codons so ausgetauscht wurde, dass die Codonhäufigkeit des synthetischen Gens der humanen entspricht, ohne dabei die Aminosäuresequenz zu verändern..

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das MSP-1-Protein das MSP-1 des Isolats 3D7, das MSP-1-Proteins das nachfolgend als "MSP-1D" bezeichnet wird. Alternativ kann das MSP-1-Protein des FCB1-Stammes sein, das nachfolgend als "MSP-1F" bezeichnet wird. Das MSP-1-Protein umfasst vorzugsweise auch Fragmente dieser

beiden Formen von MSP-1. Besonders bevorzugt sind hierbei allein oder in Kombination die Fragmente von MSP-1F p83, p30, p38, p33 und p19. Besonders bevorzugt allein oder in Kombination, wobei hier ebenfalls Kombinationen mit MSP-1F-Fragmenten umfasst werden, sind Fragmente von MSP-1D, insbesondere p83, p30, p38, p33 und p19. Insbesondere ist die Kombination p83 und p30 sowie p38 und p42 bevorzugt. Die Lage der Fragmente ergibt sich hierbei aus Abbildung 1. Ferner umfasst werden auch das Fragment p42 von beiden MSP-1-Formen.

Das MSP-1-Protein kann ebenfalls ein Mutein der *P. falciparum* MSP-1-Sequenz sein, das sich durch Addition, Deletion, Insertion, Inversion oder Substitution einer oder mehrerer Aminosäuren von der MSP-1-Sequenz des Wildtyps unterscheidet.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Virus einen zur Expression geeigneten Promotor, wobei die *msp-1*-kodierende Sequenz unter der Kontrolle des Promotors steht. Der Promotor kann hierbei ein MVA-Promotor sein, wobei der Promotor ein früher, intermediärer oder später Genpromotor oder eine Kombination davon sein kann. Jedoch sind auch nicht-MVA-Promotoren umfasst, die zur Expression in dem verwendeten Expressionssystem fähig sind. Hierbei können sowohl konstitutive als auch induzierbare Promotoren verwendet werden. Zur Large Scale Protein-Produktion kann hierbei ein starker Vaccinia Virus-Promotor, wie der synthetische späte oder frühe/späte Promotor oder das HybridVaccinia/T7 Polymerasesystem verwendet werden; zur Induktion von MHC-Klasse I – restringierter zytotoxischer T-Zellantwort *in vivo* kann bevorzugt ein natürlich vorkommender früher oder Tandem-früher/später Promotor verwendet werden; weiterhin kann das *E. coli* lac repressor/Operatorsystem oder das HybridVaccinia/T7-System zur Initiation der Genexpression verwendet werden; (Methods in Molecular Biology, Volume 62, Herausgeber Rocky S. Tuan, Humana Press, Broder und Earl, Seite 176, mit weiteren Nachweisen).

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Virus ferner einen Selektionsmarker. Der Selektionsmarker ist hierbei zur Selektion und/oder zum Screening in bekannter Weise geeignet. Geeignete Selektionsmarker umfassen hierbei beispielsweise das *E. coli* lacZ-System, das Selektions-System unter Verwendung von *E. coli* Xanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase (XGPRT)-Gen. Zusätzlich können Selektionsmethoden verwendet werden, welche die Wirtszellspezifität der Viren verändern (Staib et al., 2000). Weitere im Stand der Technik bekannte Selektionsmarker können verwendet werden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Nukleinsäure am 5 Ende mit einer Signalpeptidsequenz kodierenden Nukleotidsequenz fusioniert. Wie aus dem Stand der Technik bekannt, werden die Signal- und Anker-Sequenzen aus *P. falciparum* bei Expression in Säugerzellen nicht erkannt, bzw. nicht korrekt prozessiert (Moran und Caras, 1994; Burghaus et al., 1999; Yang et al., 1997).

Das Problem der selektiven Steuerung des intrazellulären Gating wird durch die Verwendung der Signalsequenzen des humanen "Decay-Accelerating-Factors" (DAF) gelöst (Fig. 2). Geeignete Signalpeptidsequenzen sind spezifisch für höhere Eukaryonten. Beispiele für solche Signalsequenzen neben denen des Decay-Accelerating-Factors sind Immunglobuline oder Signalpeptide verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine (von Heijne, 1985). Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform steuert die Signalpeptidsequenz die Sekretion des Genproduktes, beispielsweise Cytokine, Antikörper etc..

Ferner sind Signalsequenzen bevorzugt, die zu einer GPI-Verankerung des C-Terminus des Genproduktes an der Zelloberfläche führen, wie bei den humanen DAF. Alternativ sind Peptidsequenzen bevorzugt, die die membranständige Lokalisierung des Genproduktes steuern, wie im Falle von Immunglobulinen des M-Isotyps oder des Vesicular Stomatitis Virus-G Proteins.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das Virus ferner geeignete Splice Donor- und Splice Akzeptor-Stellen enthalten, so dass eine entsprechend gespleißte mRNA entsteht, die zur Translation innerhalb des zu behandelnden Individuums geeignet ist. Die Nukleinsäure kann ferner eine Sequenz enthalten, die als Ribosomenbindungsstelle geeignet ist.

Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Virus bereitgestellt, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

- a) Transfizieren einer eukaryontischen Wirtszelle mit einem Transfervektor, wobei der Transfervektor

- i) eine *Plasmodium falciparum* MSP-1, ein Fragment oder ein Mutein davon kodierende Nukleinsäure umfasst, wobei das Mutein sich durch Addition, Deletion, Insertion, Inversion oder Substitution einer oder mehrerer Aminosäuren von der MSP-1-Sequenz unterscheidet, und gegebenenfalls die kodierende Sequenz für einen Selektionsmarker umfasst; und DNA-Sequenzen umfasst, die als Promotoren für die Transkriptionskontrolle der kodierenden Sequenzen dienen;
 - ii) die Nukleinsäure nach i) von MVA-Sequenzen 5' und/oder 3' flankiert sind, wobei die Sequenzen zur homologen Rekombination mit genomischer MVA-DNA in der Wirtszelle geeignet sind;
- b) Infizieren mit einem Virus auf MVA-Basis, vorzugsweise MVA;
 - c) Kultivieren der Wirtszelle unter zur homologen Rekombination geeigneten Bedingungen; und
 - d) Isolieren des rekombinanten Virus auf MVA-Basis.

Bevorzugt ist die Wirtszelle ausgewählt aus RK13 (Rabbit Kidney cells), BHK21 (Baby Hamster Kidney cells) oder primären CEF (Chicken Embryo Fibroblast cells).

Der Transfervektor kann ein typischer Vaccinia Virus Transfervektor sein, der beispielsweise ausgewählt ist aus pGS20, pSC59, pMJ601, pSC65, pSC11, pCF11 und pTKgptF1s oder Vektoren die davon abgeleitet sind; siehe Methods in Molecular Biology, Volume 62, siehe vorstehend, Broder und Earl, Seite 176 und weitere darin genannte Referenzen, insbesondere Earl, Cooper und Moss (1991) in Current Protocols in molecular biology (Ausubel et al.) Wiley-Interscience, New York, Seiten 16.15.1-16.18.10. Die Transfektion erfolgt nach im Stand der Technik bekannten Bedingungen.

Die Nukleinsäure kann hierbei die für die Nukleinsäure des Virus ausgeführten Modifikationen haben.

Die Nukleinsäure nach i) ist von MVA-Sequenzen oder Komplementären davon 5' und/oder 3' flankiert; bevorzugte flankierende MVA-Sequenzen sind DNA Sequenzen jeweils 5' und 3' von natürlich aufgetretenen Deletionsstellen im MVA-Genom, z. B.

Deletionsstellen II, III, oder VI wie beschrieben in Meyer H., Sutter G., Mayr A. (1991) J. Gen. Virol. 72, 1031-1038 bzw. wie ersichtlich aus der vollständigen Genomsequenz des MVA-Virus (Antoine et al 1998, Virology 244, 365-396). Vorzugsweise umfasst der Transfervektor weiterhin einen Selektionsmarker wie beispielsweise eine Antibiotikaresistenz oder einen Stoffwechselmarker. Grundsätzlich sind jedoch alle im Stand der Technik bekannten Selektionsmarker umfasst.

Zur effizienten homologen Rekombination sollten die die zu inserierende Nukleinsäure flankierenden MVA-DNA-Sequenzen eine Länge von jeweils wenigstens 0.5 kb aufweisen.

Die Wirtszelle wird mit dem Transfektionsvektor transfiziert nach bekannten Verfahren. Die Infektion mit MVA erfolgt nach Standardbedingungen (Staib et al., 2000).

Das Isolieren des rekombinanten MVA-Virus erfolgt auf der Grundlage des Selektionsmarkers innerhalb der Sequenz nach Alternative (i). Das rekombinante MVA-Virus kann entweder direkt aus dem Lysat der kultivierten Wirtszellen oder aus dem Kulturüberstand gewonnen werden.

Nach einer weiteren Ausführungsform wird ein Vakzin bereit gestellt, das umfasst:

- a) das erfindungsgemäße rekombinante Virus; und
- b) einen pharmakologisch verträglichen Träger.

Als pharmakologisch verträgliche Träger sind hierbei sämtliche im Stand der Technik bekannten Träger und Verdünnungsmittel geeignet. Sofern eine bestimmte Applikationsart beabsichtigt ist, kann der pharmakologisch verträgliche Träger in bekannter Weise ausgewählt oder geändert werden.

Das Vakzin kann subkutan, intramuskulär, intravenös, transdermal, intraperitoneal oder oral verabreicht werden. Das Vakzin wird zur Prophylaxe und/oder Therapie von Malaria bei Mensch und Tier angegeben.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform kann das Vakzin ferner MSP-1, ein Fragment oder ein Mutein davon, das sich durch Addition, Deletion, Insertion, Inversion oder Substitution einer oder mehrerer Aminosäuren von der *Plasmodium falciparum*

MSP-1-Sequenz unterscheidet, und/oder eine dieses kodierende Nukleinsäure enthalten. Besonders bevorzugt ist das MSP-1-Protein hierbei rekombinant hergestellt, insbesondere rekombinant in *E. coli*. Die MSP-1 oder ein Mutein davon kodierende Nukleinsäure ist, vorzugsweise eine solche, die bezüglich ihres AT-Gehaltes verringert ist. Insbesondere bevorzugt ist eine solche Nukleinsäure wie in DE-19640817 A1 beschrieben, bei der insbesondere *Plasmodium falciparum*-Codons gegen humane Codons ausgetauscht sind, ohne die Aminosäure-Sequenz hierbei zu verändern.

Sofern das Vakzin sowohl das rekombinante Virus als auch MSP-1, ein Fragment oder ein Mutein davon bzw. die kodierende Nukleinsäure umfasst, so kann das Vakzin in Kit-Form vorliegen. Es ist somit geeignet zur simultanen, sequenziellen oder getrennten Verabreichung der beiden Komponenten des Vakzins.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung veranschaulichen, beschränken jedoch nicht deren Gegenstand.

Fig. 1: Primäre Struktur der MSP-1 aus den *P. falciparum* Stämmen FCB-1 und MAD20.

Die Pfeile oberhalb der Sequenz kennzeichnen die Prozessierungsstellen der nativen Proteine (Holder et al., 1987), welche MSP-1 in die Fragmenten p83, p30, p38 und p42 teilen, die als Komplex auf der Parasitenoberfläche verankert sind. Im zweiten Prozessierungsschritt wird p42 zu p33 und p19 gespalten. Die Pfeile unterhalb der Darstellungen bezeichnen die einmalig vorkommenden Endonuklease-Schnittstellen der synthetischen DNA-Sequenzen.

Abkürzungen: SP = Signalpeptid, GA = GPI-Anker

Fig. 2: Expression von *msp1d-38/42* in mit rekombinanten MVA-infizierten HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit rMVA-*msp1d/38+42S* bzw. rMVA-*msp1d/38+42A* infiziert und anschließend fixiert. Die zweite und vierte Zeile zeigt jeweils Zellen, die nach der Fixierung mit Triton X-100 permeabilisiert wurden, während die Membran der Zellen in Zeile eins und drei intakt blieb. Die so behandelten Zellen wurden mit mAk 5.2, der ein für MSP-1spezifisches, konformationelles Epitop in C-terminalen Teil des MSP-1-Fragments p19 erkennt und einem polyklonalen Serum, das das ER-Protein Sec61 β erkennt (anti-ER-Marker), als erstem Antikörper inkubiert, diese über Cy3-konjugierte anti-Maus-IgG (erkennt mAk 5.2) bzw. FITC-konjugierte anti-Kaninchen-IgG (erkennt

anti-Sec61beta) farblich markiert und anschließend im konfokalen Mikroskop analysiert. Wurden die Zellen mit rMVA-msp1d/38+42S bzw. rMVA-msp1d/38+42A infiziert und permeabilisiert, so kann das Signal für MSP-1D-38/42 (mAk 5.2) kolokalisiert werden mit dem ER-Marker. Blieben die Zellen hingegen unversehrt, so wird MSP-1D-38/42 nur im Fall der Infektion mit rMVA-msp1d/38+42A auf der Oberfläche der infizierten Zellen erkannt. Der ER-Marker fungierte hier als Kontrolle für die Unversehrtheit der Zellmembran.

Abkürzungen: ER = Endoplasmatisches Retikulum; mAk = monoklonaler Antikörper

Fig. 3: Nachweis von MSP-1D-42 und MSP-1D-38/42 in mit rekombinanten MVA infizierten HeLa-Zellen mittels Immunoblot

A HeLa-Zellen wurden mit rMVA-msp1d/42S, rMVA-msp1d/42A, rMVA-msp1d/38+42S bzw. rMVA-msp1d/38+42A infiziert und über Nacht inkubiert. Proben des Überstands und der zellulären Fraktion wurden über SDS-Gel-Elektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mittels mAb 5.2 als Erstantikörper nachgewiesen. Nur Chimäre aus DAF-Signalsequenz und den entsprechenden MSP-1D-Fragmenten lassen sich in den Überständen der infizierten Zellen nachweisen, während die intrazelluläre Expression in allen mit rekombinanten MVA infizierten Zellen ein Signal liefert.

Fig. 4: Entwicklung der humoralen Immunantwort nach drei Immunisierungen mit rMVA-msp1d/42S bzw. rMVA-msp1d/42A und einer Immunisierung mit MSP-1D-HX42 aus *E. coli*

In A ist die Analyse der humoralen Immunantwort mittels ELISA mit rekombinant hergestelltem MSP-1D-HX42 aufgereinigt aus *E. coli* als Antigen dargestellt. Die Kurven zeigen die p42 spezifische Antikörperentwicklung, gemessen an der $OD_{405} = 1$. Die Mäuse wurden jeweils im Abstand von drei Wochen mit 10^6 IU (Erstimmunisierung, zeitgleich mit der Blutentnahme S0) bzw. 10^8 IU (1. und 2. Boost, zeitgleich mit S1 und S2) rMVA-msp1d/42S immunisiert. Zusätzlich wurde den Mäusen nach weiteren vier Wochen je $5\mu\text{g}$ MSP-1D-HX42 aus *E. coli* in unkompletten Freund'schem Adjuvans subcutan injiziert (eine Woche nach der Blutentnahme S3). S0 bis S5 stellen die Zeitpunkte der Blutentnahme dar, dabei wurde das Blut S0 bis S3 jeweils im Abstand von drei Wochen entnommen, die Entnahme von S4 und S5 erfolgte jeweils im Abstand von 4 Wochen. die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Immunisierungen. Der Stern markiert die vierte Immunisierung mit MSP-1D-HX42 aus *E. coli*.

B zeigt die gleiche Analyse für die Immunisierung mit rMVA-msp1d/42A.

Fig. 5: Entwicklung der humoralen Immunantwort nach Immunisierungen mit rMVA-msp1d/S bzw. rMVA-msp1d/83+30/38+42A in Kombination mit Immunisierung mit MSP-1D aus *E. coli*

Die humorale Immunantwort wurde mittels ELISA unter Verwendung von rekombinant hergestelltem MSP-1D aufgereinigt aus *E. coli* als Antigen ermittelt. Wie in Fig.4 zeigen die Kurven die MSP-1D-spezifische Antikörperentwicklung, gemessen an der $OD_{405} = 1$. Die Mäuse wurden jeweils im Abstand von 3 Wochen immunisiert (in der Abbildung durch Pfeile gekennzeichnet). Die den Gruppen zugeordneten Immunisierungsstrategien setzten sich wie folgt zusammen:

Gr. 1: 20 µg MSP-1D (Tag 0), 10^8 IU rMVA-msp1d/S (Tag 21), 5 Mäuse

Gr. 2: 20 µg MSP-1D (Tag 0), 10^8 IU rMVA-msp1d/A (Tag 21), 5 Mäuse

Gr. 3: 20 µg MSP-1D (Tag 0), 10^8 IU rMVA-msp1d/S (Tag 21), 20 µg MSP-1D (Tag 42), 10 Mäuse

Gr. 4: 20 µg MSP-1D (Tag 0), 10^8 IU rMVA-msp1d/S (Tag 21), 10^8 IU rMVA-msp1d/S (Tag 42), 10 Mäuse

Gr. 5: 20 µg MSP-1D (Tag 0), 10^8 IU rMVA-msp1d/83+30/38+42A (Tag 21), 20 µg MSP-1D (Tag 42) 9 Mäuse

Gr. 6: 20 µg MSP-1D (Tag 0), 10^8 IU rMVA-msp1d/83+30/38+42A (Tag 21), 10^8 IU rMVA-msp1d/83+30/38+42A (Tag 42), 10 Mäuse

Gr. 7: 20 µg MSP-1D (Tag 0), 10^8 IU rMVA-msp1d/A (Tag 21), 20 µg MSP-1D (Tag 42), 5 Mäuse

Im folgenden werden rekombinante Viren, welche zur Herstellung von MSP-1 in seiner Oberflächen-verankerten Form führen, mit „A“ und solche zur Sekretion von MSP-1 durch „S“ gekennzeichnet.

Tabelle 1 Vollständige Liste der im Rahmen der Erfindung hergestellten Virus-Konstrukte:

	rMVA-msp1d	rMVA-msp1f
sekretiertes MSP-1	rMVA-msp1d/S rMVA-msp1d/83S rMVA-msp1d/83+30S rMVA-msp1d/42S rMVA-msp1d/38+42S	

Oberflächen- verankertes MSP-1	rMVA-msp1d/A rMVA-msp1d/83A rMVA-msp1d/83+30A rMVA-msp1d/42A rMVA-msp1d/38+42A rMVA-msp1d/83+30/38+42A	rMVA-msp1f/A rMVA-msp1f/83+30/38+42A rMVA-msp1f/38+42A
-----------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------

Die Herstellung von MSP-1 bzw. der Fragmente und die Lokalisation der Proteine in der infizierten Zelle wurde mittels konfokaler Mikroskopie belegt und ist exemplarisch für die Infektion von HeLa-Zellen durch rMVA-msp1d/38+42S und rMVA-msp1d/38+42A dargestellt (Fig. 2).

Die Sekretion aller MSP-1-Varianten aus mit rekombinanten MVA infizierten Zellen wurde über Immunoblot-Analysen zellulärer Überstände nachgewiesen und ist hier exemplarisch für rMVA-msp1d/42S und rMVA-msp1d/38+42S dargestellt (Fig. 3).

Anschließend wurden die rekombinanten MVA in Immunisierungsversuchen an Mäusen auf ihre immunogene Wirkung bezüglich der humoralen Immunantwort untersucht. Dabei induzierten für *msp-1* rekombinanten MVA hohe Antikörpertiter gegen das Parasitenprotein, die über ELISA bestimmt wurden. Die p42-spezifischen Antikörpertiter und das beobachtete, unterschiedliche Immunisierungspotential der durch rekombinante MVA hergestellten Oberflächen-verankerten bzw. sekretierten Proteine wird exemplarisch für Immunisierungen mit rMVA-msp1d/42S und rMVA-msp1d/42A dargestellt (Fig. 4).

Literatur

Aidoo, M., Lalvani, A., Whittle, H. C., Hill, A. V., and Robson, K. J. (1997). Recombinant vaccinia viruses for the characterization of *Plasmodium falciparum*-specific cytotoxic T lymphocytes: recognition of processed antigen despite limited re-stimulation efficacy. *Int Immunol* 9, 731-7.

Allsopp, C. E., Plebanski, M., Gilbert, S., Sinden, R. E., Harris, S., Frankel, G., Dougan, G., Hioe, C., Nixon, D., Paoletti, E., Layton, G., and Hill, A. V. (1996). Comparison of numerous delivery systems for the induction of cytotoxic T lymphocytes by immunization. *Eur J Immunol* 26, 1951-9.

Antoine, G., Scheifflinger, F., Dorner, F., and Falkner, F. G. (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: Comparison with other Orthopoxviruses. *Virology* 244, 365-396.

Chang, S. P., Case, S. E., Gosnell, W. L., Hashimoto, A., Kramer, K. J., Tam, L. Q., Hashiro, C. Q., Nikaido, C. M., Gibson, H. L., Lee-Ng, C. T., Barr, P. J., Yokota, B. T., and Hut, G. S. (1996). A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria. *Infect Immun* 64, 253-61.

Daly, T. M., and Long, C. A. (1993). A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. *Infect. Immun.* 61, 2462-7.

Degano, P., Schneider, J., Hannan, C. M., Gilbert, S. C., and Hill, A. V. (1999). Gene gun intradermal DNA immunization followed by boosting with modified *Vaccinia* virus Ankara: enhanced CD8⁺ T cell immunogenicity and protective efficacy in the influenza and malaria models. *Vaccine* 18, 623-32.

Egan, A. F., Blackman, M. J., and Kaslow, D. C. (2000). Vaccine efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in malaria-naive, -exposed, and/or -rechallenged *Aotus vociferans* monkeys. *Infect Immun* 68, 1418-27.

Etlinger, H. M., and Altenburger, W. (1991). Overcoming inhibition of antibody responses to a malaria recombinant vaccinia virus caused by prior exposure to wild type virus. *Vaccine* 9, 470-2.

Genton, B., Al-Yaman, F., Anders, R., Saul, A., Brown, G., Pye, D., Irving, D. O., Briggs, W. R., Mai, A., Ginny, M., Adiguma, T., Rare, L., Giddy, A., Reber-Liske, R., Stuerchler, D., and Alpers, M. P. (2000). Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine in adults living in an endemic area of Papua New Guinea. *Vaccine* 18, 2504-11.

Gilbert, S. C., Schneider, J., Plebanski, M., Hannan, C. M., Blanchard, T. J., Smith, G. L., and Hill, A. V. (1999). Ty virus-like particles, DNA vaccines and Modified Vaccinia Virus Ankara; comparisons and combinations. *Biol Chem* 380, 299-303.

Hirunpetcharat, C., Tian, J. H., Kaslow, D. C., van Rooijen, N., Kumar, S., Berzofsky, J. A., Miller, L. H., and Good, M. F. (1997). Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1[19]) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4+ T cells. *J Immunol* 159, 3400-11.

Holder, A. A., and Freeman, R. R. (1981). Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. *Nature*. 294, 361-364.

Holder, A. A., Sandhu, J. S., Hillman, Y., Davey, L. S., Nicholls, S. C., Cooper, H., and Lockyer, M. J. (1987). Processing of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 94, 199-208.

Kaslow, D. C., Isaacs, S. N., Quakyi, I. A., Gwadz, R. W., Moss, B., and Keister, D. B. (1991). Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies by recombinant vaccinia virus. *Science* 252, 1310-1313.

Keitel, W. A., Kester, K. E., Atmar, R. L., White, A. C., Bond, N. H., Holland, C. A., Krzych, U., Palmer, D. R., Egan, A., Diggs, C., Ballou, W. R., Hall, B. F., and Kaslow, D. (1999). Phase I trial of two recombinant vaccines containing the 19kd carboxy terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (msp-1(19)) and T helper epitopes of tetanus toxoid. *Vaccine* 18, 531-9.

Kumar, S., Yadava, A., Keister, D. B., Tian, J. H., Ohl, M., Perdue-Greenfield, K. A., Miller, L. H., and Kaslow, D. C. (1995). Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in Aotus monkeys. *Mol Med* 1, 325-32.

Ling, I. T., Ogun, S. A., and Holder, A. A. (1994). Immunization against malaria with a recombinant protein. *Parasite Immunol* 16, 63-7.

Majarian, W. R., Daly, T. M., Weidanz, W. P., and Long, C. A. (1984). Passive immunization against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 132, 3131-3137.

Matsumoto, S., Yukitake, H., Kanbara, H., and Yamada, T. (1999). Long-lasting protective immunity against rodent malaria parasite infection at the blood stage by recombinant BCG secreting merozoite surface protein-1. *Vaccine* 18, 832-4.

Meyer, H., Sutter, G., and Mayr, A. (1991). Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* 72, 1031-8.

Moran, P., and Caras, I. W. (1994). Requirements for glycosylphosphatidylinositol attachment are similar but not identical in mammalian cells and parasitic protozoa. *J Cell Biol* 125, 333-43.

Moss, B., Carroll, M. W., Wyatt, L. S., Bennink, J. R., Hirsch, V. M., Goldstein, S., Elkins, W. R., Fuerst, T. R., Lifson, J. D., Piatak, M., Restifo, N. P., Overwijk, W., Chamberlain, R., Rosenberg, S. A., and Sutter, G. (1996). Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. *Adv Exp Med Biol* 397, 7-13.

Ockenhouse, C. F., Sun, P. F., Lanar, D. E., Welde, B. T., Hall, B. T., Kester, K., Stoute, J. A., Magill, A., Krzych, U., Farley, L., Wirtz, R. A., Sadoff, J. C., Kaslow, D. C., Kumar, S., Church, L. W., Crutcher, J. M., Wizen, B., Hoffman, S., Lalvani, A., Hill, A. V., Tine, J. A., Guito, K. P., de Taisne, C., Anders, R., Ballou, W. R., and et al. (1998). Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 177, 1664-73.

Perrin, L. H., Merkli, B., Loche, M., Chizzolini, C., Smart, J., and Richle, R. (1984). Antimalarial immunity in *Saimiri* monkeys. Immunization with surface components of asexual blood stages. *J. Exp. Med.* 160, 441-451.

Plebanski, M., Gilbert, S. C., Schneider, J., Hannan, C. M., Layton, G., Blanchard, T., Becker, M., Smith, G., Butcher, G., Sinden, R. E., and Hill, A. V. (1998). Protection from *Plasmodium berghei* infection by priming and boosting T cells to a single class I-restricted epitope with recombinant carriers suitable for human use. *Eur J Immunol* 28, 4345-55.

Pye, D., Edwards, S. J., Anders, R. F., O'Brien, C. M., Franchina, P., Corcoran, L. N., Monger, C., Peterson, M. G., Vandenberg, K. L., Smythe, J. A., Westley, S. R., Coppel, R. L., Webster, T. L., Kemp, D. J., Hampson, A. W., and Langford, C. J. (1991). Failure of recombinant vaccinia viruses expressing *Plasmodium falciparum* antigens to protect *Saimiri* monkeys against malaria. *Infect. Immun.* 59, 2403-2411.

Riley, E. M., Allen, S. J., Wheeler, J. G., Blackman, M. J., Bennett, S., Takacs, B., Schonfeld, H. J., Holder, A. A., and Greenwood, B. M. (1992). Naturally acquired cellular and humoral

immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.* 14, 321-337.

Riley, E. M., Morris-Jones, S., Blackman, M. J., Greenwood, B. M., and Holder, A. A. (1993). A longitudinal study of naturally acquired cellular and humoral immune responses to a merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission. *Parasite Immunol.* 15, 513-524.

Saul, A., Lawrence, G., Smillie, A., Rzepczyk, C. M., Reed, C., Taylor, D., Anderson, K., Stowers, A., Kemp, R., Allworth, A., Anders, R. F., Brown, G. V., Pye, D., Schoofs, P., Irving, D. O., Dyer, S. L., Woodrow, G. C., Briggs, W. R., Reber, R., and Sturchler, D. (1999). Human phase I vaccine trials of 3 recombinant asexual stage malaria antigens with Montanide ISA720 adjuvant. *Vaccine* 17, 3145-59.

Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K. J., Hannan, C. M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G. L., and Hill, A. V. (1998). Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 4, 397-402.

Siddiqui, W. A., Tam, L. Q., Kramer, K. J., Hui, G. S., Case, S. E., Yamaga, K. M., Chang, S. P., Chan, E. B., and Kan, S. C. (1987). Merozoite surface coat precursor protein completely protects *Aotus* monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3014-3018.

Staib, C., Drexler, I., Ohlmann, M., Wintersperger, S., Erfle, V., and Sutter, G. (2000). Transient host range selection for genetic engineering of modified vaccinia virus Ankara. *Biotechniques* 28, 1137-42, 1144-6, 1148.

Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V., Mayr, A., Huber, H. C., Schafer, H., and Holzner, A. (1974). [MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (author's transl)]. *Dtsch Med Wochenschr* 99, 2386-92.

Stowers, A. W., Cioce, V., Shimp, R. L., Lawson, M., Hui, G., Muratova, O., Kaslow, D. C., Robinson, R., Long, C. A., and Miller, L. H. (2001). Efficacy of two alternate vaccines based on *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in an *Aotus* challenge trial. *Infect Immun* 69, 1536-46.

Sutter, G., and Moss, B. (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10847-51.

Tanabe, K., Mackay, M., Goman, M., and Scaife, J. G. (1987). Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* 195, 273-287.

Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., Davis, S. W., van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., and et al. (1992). NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 188, 217-32.

Tian, J. H., Miller, L. H., Kaslow, D. C., Ahlers, J., Good, M. F., Alling, D. W., Berzofsky, J. A., and Kumar, S. (1996). Genetic regulation of protective immune response in congenic strains of mice vaccinated with a subunit malaria vaccine. *J Immunol* 157, 1176-83.

Tine, J. A., Lanar, D. E., Smith, D. M., Welde, B. T., Schultheiss, P., Ware, L. A., Kauffman, E. B., Wirtz, R. A., De Taisne, C., Hui, G. S., Chang, S. P., Church, P., Hollingdale, M. R., Kaslow, D. C., Hoffman, S., Guito, K. P., Ballou, W. R., Sadoff, J. C., and Paoletti, E. (1996). NYVAC-Pf7: a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 64, 3833-44.

Tolle, R., Fruh, K., Doumbo, O., Koita, O., N'Diaye, M., Fischer, A., Dietz, K., and Bujard, H. (1993). A prospective study of the association between the human humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stage antigen gp190 and control of malarial infections. *Infect Immun* 61, 40-7.

von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* 184, 99-105.

Wunderlich, G., Moura, I. C., and del Portillo, H. A. (2000). Genetic immunization of BALB/c mice with a plasmid bearing the gene coding for a hybrid merozoite surface protein 1-hepatitis B virus surface protein fusion protects mice against lethal *Plasmodium chabaudi* PC1 infection. *Infect Immun* 68, 5839-45.

Yang, S., Carroll, M. W., Torres-Duarte, A. P., Moss, B., and Davidson, E. A. (1997). Addition of the MSA1 signal and anchor sequences to the malaria merozoite surface antigen 1 C-terminal region enhances immunogenicity when expressed by recombinant vaccinia virus. *Vaccine* 15, 1303-13.

Ansprüche:

1. Rekombinantes Virus auf MVA-Basis, vorzugsweise ein rekombinantes MVA-Virus, umfassend wenigstens eine ein *Plasmodium falciparum* MSP-1-Protein, ein Fragment oder Mutein davon kodierende Nukleinsäure.
2. Rekombinantes Virus nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das MSP-1-Protein das MSP-1-Protein des Isolates 3D7 oder das MSP-1-Protein des FCB1-Stammes ist.
3. Rekombinantes Virus nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Fragment ausgewählt ist aus den Fragmenten p83, p30, p38, p33, p19 und p42 oder Kombinationen davon.
4. Rekombinantes Virus nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sich das Mutein durch Addition, Deletion, Insertion, Inversion und/oder Substitution einer oder mehrerer Aminosäuren von der MSP-1-Sequenz unterscheidet.
5. Rekombinantes Virus nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die MSP-1 kodierende Nukleinsäure gegenüber der Wildtyp-Sequenz in ihrem AT-Gehalt verringert ist.
6. Rekombinantes Virus nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure unter der Kontrolle eines Promotors steht.
7. Rekombinantes Virus nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure am 5' Ende mit einer eine Signalpeptidsequenz kodierenden Nukleotidsequenz fusioniert ist.
8. Rekombinantes Virus nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Signalpeptidsequenz die Sekretion des Genproduktes steuert.
9. Rekombinantes Virus nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Signalpeptidsequenz die membranständige Lokalisierung des Genproduktes steuert.

10. Rekombinantes Virus nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Signalsequenz die GPI-Verankerung des Genproduktes steuert.
11. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Virus auf MVA-Basis, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:
- a) Transfizieren einer eukaryontischen Wirtszelle mit einem Transfervektor, wobei der Transfervektor
 - i) eine ein *Plasmodium falciparum* MSP-1-Protein, ein Fragment oder ein Mutein davon kodierende Nukleinsäure umfasst, wobei das Mutein sich durch die Addition, Deletion, Insertion, Inversion und/oder Substitution einer oder mehrerer Aminosäuren von der MSP-1-Sequenz unterscheidet; und gegebenenfalls ferner einen Selektionsmarker umfasst;
 - ii) die Nukleinsäure nach i) von MVA-Sequenzen 5' und/oder 3' flankiert sind, wobei die Sequenzen zur homologen Rekombination in der Wirtszelle geeignet sind;
 - b) Infizieren mit einem Virus auf MVA-Basis, vorzugsweise MVA;
 - c) Kultivieren der Wirtszelle unter zur homologen Rekombination geeigneten Bedingungen; und
 - d) Isolieren des rekombinanten Virus auf MVA-Basis.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Virus aus dem Kulturüberstand oder den kultivierten Wirtszellen isoliert wird.
13. Vakzin umfassend:
- a) das rekombinante Virus nach einem der Ansprüche 1 bis 9; und
 - b) einen pharmakologisch verträglichen Träger.

14. Vakzin gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Vakzin ferner als Bestandteil c) MSP-1, ein Fragment oder ein Mutein davon und/oder eine diese kodierende Nukleinsäure enthält.
15. Vakzin gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestandteile a) und c) simultan, sequenziell oder getrennt verabreicht werden können.
16. Verwendung des rekombinanten Virus gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Prophylaxe und/oder Therapie von Malaria.
17. Verwendung des rekombinanten Virus gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 und von MSP-1, eines Fragmentes oder eines Muteins davon und/oder eine diese kodierende Nukleinsäure zur Prophylaxe und/oder Therapie von Malaria.

Fig. 1

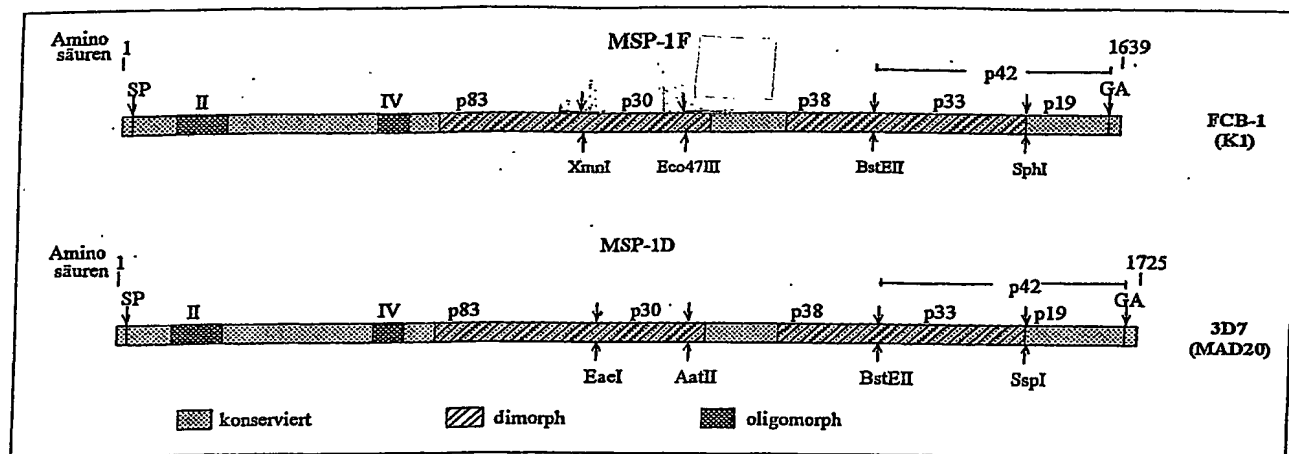


Fig. 2

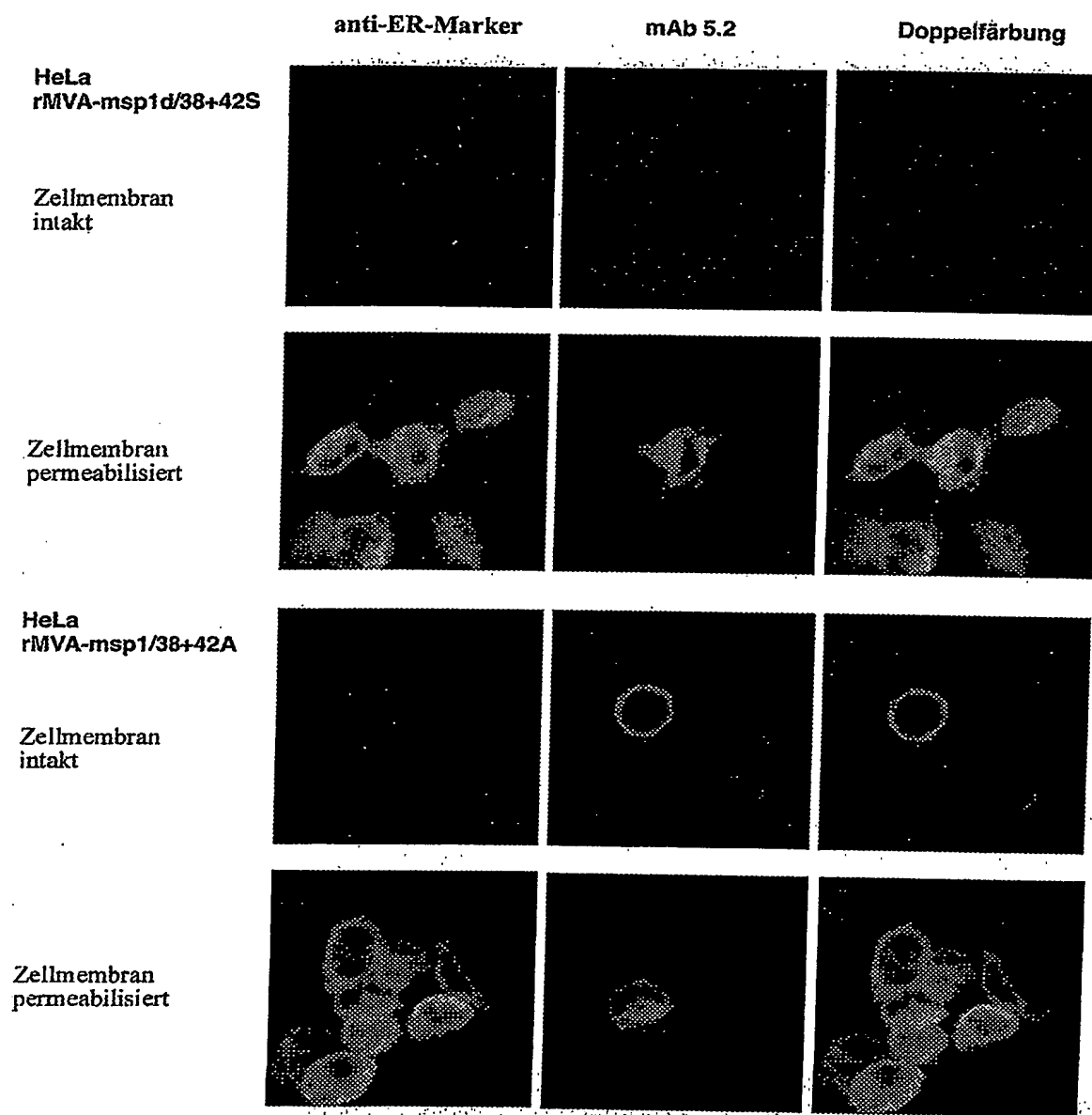


Fig. 3

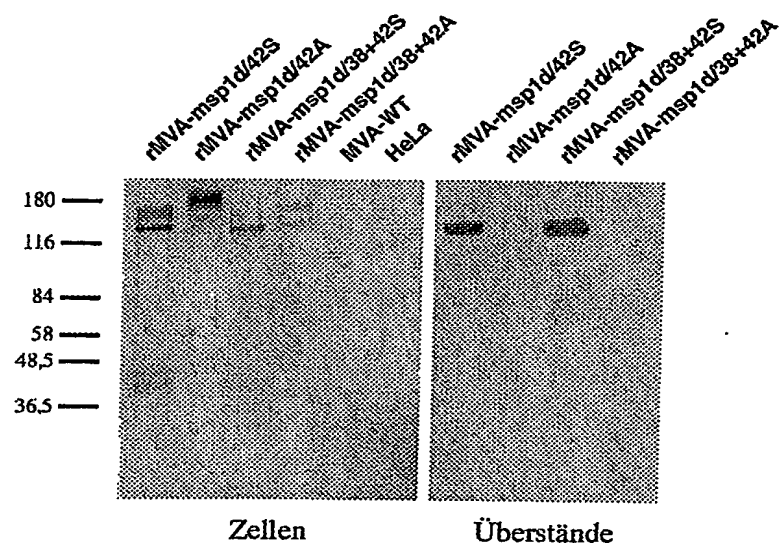
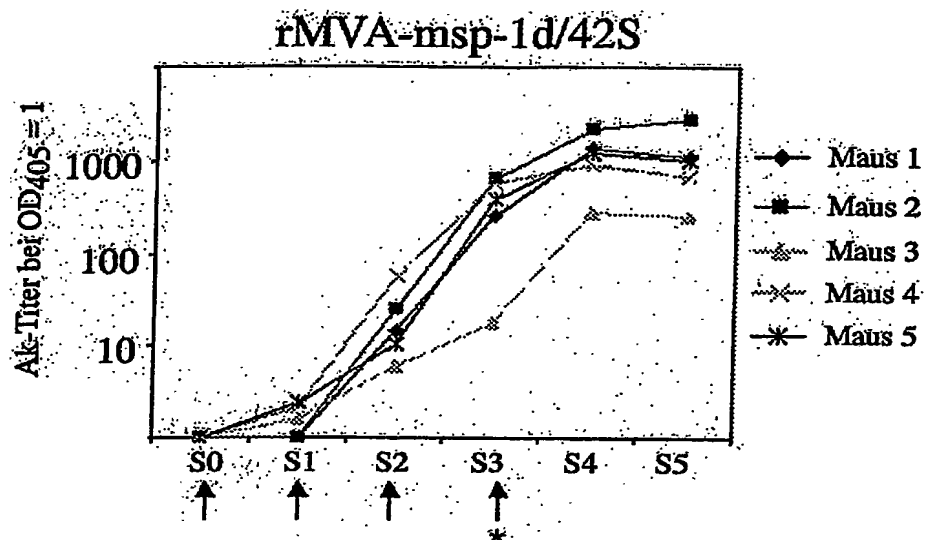


Fig. 4

A



B

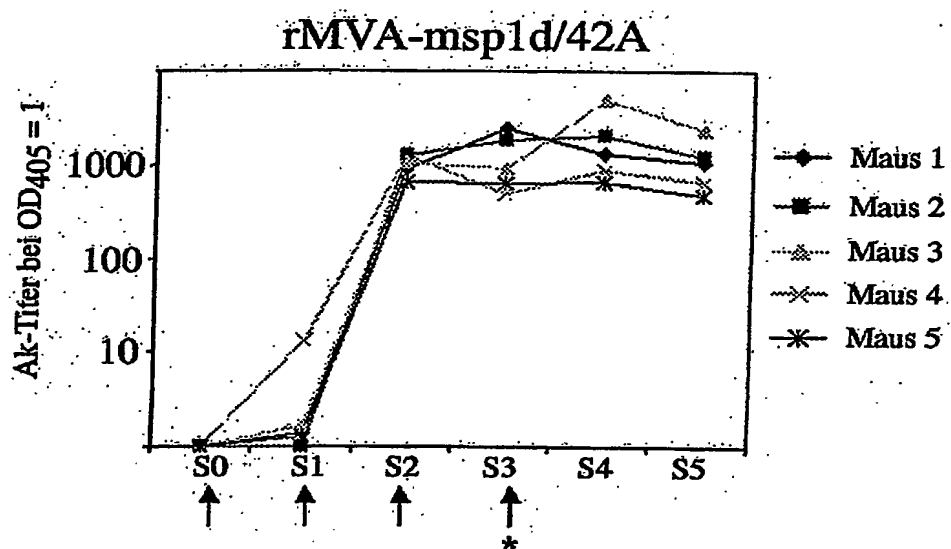
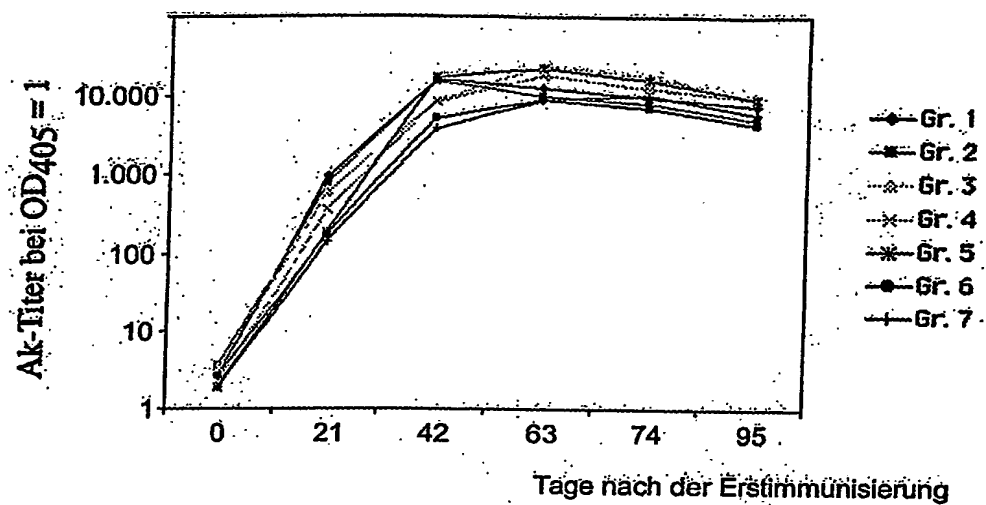


Fig. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/10723

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/30 C12N15/863 A61K39/002		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHUTONG Y ET AL: "Addition of the MSA1 signal and anchor sequences to the malaria merozoite surface antigen 1 C-terminal region enhances immunogenicity when expressed by recombinant vaccinia virus" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 15, no. 12-13, 1 August 1997 (1997-08-01), pages 1303-1313, XP004089472 ISSN: 0264-410X the whole document	1,3,4, 6-17
Y	the whole document	3,5
Y	US 6 214 353 B1 (DE TAISNE CHARLES ET AL) 10 April 2001 (2001-04-10) the whole document	3
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 February 2004		Date of mailing of the international search report 01/03/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schulz, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/10723

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 196 40 817 A (BUJARD HERMANN PROF DR) 14 May 1998 (1998-05-14) the whole document	5
A	----- SCHNEIDER J ET AL: "ENHANCED IMMUNOGENICITY FOR CD8+ T CELL INDUCTION AND COMPLETE PROTECTIVE EFFICACY OF MALARIA DNA VACCINATION BY BOOSTING WITH MODIFIED VACCINIA VIRUS ANKARA" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 4, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 397-402, XP000739989 ISSN: 1078-8956 the whole document	1-17
A	----- OBER B T ET AL: "Immunogenicity and safety of defective vaccinia virus Lister: Comparison with modified vaccinia virus Ankara" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 76, no. 15, August 2002 (2002-08), pages 7713-7723, XP002270126 ISSN: 0022-538X the whole document	1
A	----- WO 02 24224 A (GILBERT SARAH ;MC SHANE HELEN (GB); REECE WILLIAM (GB); HILL ADRIAN) 28 March 2002 (2002-03-28) page 10, line 23 -page 15, line 12	
A	----- GOOD M F ET AL: "Immune effector mechanisms in malaria" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, XX, vol. 11, no. 4, August 1999 (1999-08), pages 412-419, XP004257559 ISSN: 0952-7915 page 415, right-hand column, paragraph 3 -page 416, right-hand column, paragraph 3	
A	----- RAMSHAW I A ET AL: "The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 163-165, XP004194963 ISSN: 0167-5699 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/10723

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 16 and 17 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/10723

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6214353	B1	10-04-2001	US 5756101 A	26-05-1998
			US 5766597 A	16-06-1998
DE 19640817	A	14-05-1998	DE 19640817 A1	14-05-1998
			AU 727864 B2	04-01-2001
			AU 4864997 A	24-04-1998
			CN 1236391 A	24-11-1999
			WO 9814583 A2	09-04-1998
			EP 0929677 A2	21-07-1999
			ID 22037 A	26-08-1999
			JP 2000516477 T	12-12-2000
WO 0224224	A	28-03-2002	AU 8610901 A	02-04-2002
			CA 2422094 A1	28-03-2002
			EP 1320379 A2	25-06-2003
			WO 0224224 A2	28-03-2002
			GB 2384709 A	06-08-2003
			US 2003138454 A1	24-07-2003
			US 2004018177 A1	29-01-2004

INTERNATIONALE RESEARCHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/10723

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/30 C12N15/863 A61K39/002		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N A61K C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SHUTONG Y ET AL: "Addition of the MSA1 signal and anchor sequences to the malaria merozoite surface antigen 1 C-terminal region enhances immunogenicity when expressed by recombinant vaccinia virus" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, Bd. 15, Nr. 12-13, 1. August 1997 (1997-08-01), Seiten 1303-1313, XP004089472 ISSN: 0264-410X	1,3,4, 6-17
Y	das ganze Dokument	3,5
Y	US 6 214 353 B1 (DE TAISNE CHARLES ET AL) 10. April 2001 (2001-04-10) das ganze Dokument	3
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 13. Februar 2004		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 01/03/2004
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Schulz, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 196 40 817 A (BUJARD HERMANN PROF DR) 14. Mai 1998 (1998-05-14) das ganze Dokument	5
A	----- SCHNEIDER J ET AL: "ENHANCED IMMUNOGENICITY FOR CD8+ T CELL INDUCTION AND COMPLETE PROTECTIVE EFFICACY OF MALARIA DNA VACCINATION BY BOOSTING WITH MODIFIED VACCINIA VIRUS ANKARA" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, Bd. 4, Nr. 4, April 1998 (1998-04), Seiten 397-402, XP000739989 ISSN: 1078-8956 das ganze Dokument	1-17
A	----- OBER B T ET AL: "Immunogenicity and safety of defective vaccinia virus Lister: Comparison with modified vaccinia virus Ankara" JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 76, Nr. 15, August 2002 (2002-08), Seiten 7713-7723, XP002270126 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument	1
A	----- WO 02 24224 A (GILBERT SARAH ;MC SHANE HELEN (GB); REECE WILLIAM (GB); HILL ADRIAN) 28. März 2002 (2002-03-28) Seite 10, Zeile 23 -Seite 15, Zeile 12	
A	----- GOOD M F ET AL: "Immune effector mechanisms in malaria" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, XX, Bd. 11, Nr. 4, August 1999 (1999-08), Seiten 412-419, XP004257559 ISSN: 0952-7915 Seite 415, rechte Spalte, Absatz 3 -Seite 416, rechte Spalte, Absatz 3	
A	----- RAMSHAW I A ET AL: "The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 21, Nr. 4, April 2000 (2000-04), Seiten 163-165, XP004194963 ISSN: 0167-5699 das ganze Dokument	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/10723

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 16 und 17 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/10723

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6214353	B1	10-04-2001	US 5756101 A	26-05-1998
			US 5766597 A	16-06-1998
DE 19640817	A	14-05-1998	DE 19640817 A1	14-05-1998
			AU 727864 B2	04-01-2001
			AU 4864997 A	24-04-1998
			CN 1236391 A	24-11-1999
			WO 9814583 A2	09-04-1998
			EP 0929677 A2	21-07-1999
			ID 22037 A	26-08-1999
			JP 2000516477 T	12-12-2000
WO 0224224	A	28-03-2002	AU 8610901 A	02-04-2002
			CA 2422094 A1	28-03-2002
			EP 1320379 A2	25-06-2003
			WO 0224224 A2	28-03-2002
			GB 2384709 A	06-08-2003
			US 2003138454 A1	24-07-2003
			US 2004018177 A1	29-01-2004